

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**TUMOR SUPRESORSKI GENI I MEHANIZMI POPRAVKA OŠTEĆENE DNA U STA-  
NICAMA TUMORA**

**TUMOR SUPPRESSOR GENES AND MECHANISMS OF DNA REPAIR IN TUMOR  
CELLS**

**SEMINARSKI RAD**

**Vanja Jurić**

**Preddiplomski studij molekularne biologije**  
**(Undergraduate Study of Molecular Biology)**

**Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić**

**Zagreb, 2017.**

# Sadržaj

<b>1</b>	<b>Uvod.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Tumor supresori.....</b>	<b>3</b>
2.1	BRCA2.....	3
2.1.1	Struktura BRCA2 proteina .....	3
2.1.2	Funkcije BRCA2 i BRCA1 .....	4
2.2	TP53 .....	5
2.2.1	Struktura p53 proteina .....	5
2.2.2	Funkcije TP53.....	6
2.2.3	Izoforme p53 .....	9
2.2.4	Agregacija p53 proteina.....	10
2.3	PTEN.....	11
2.3.1	Struktura PTEN proteina.....	11
2.3.2	Funkcije PTEN-a.....	12
<b>3</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Sažetak .....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Summary.....</b>	<b>17</b>

# 1 Uvod

Tumor supresori su geni esencijalni za kontrolu proliferacije stanica, aktivaciju apoptoze da bi se eliminirale neželjene stanice, za povezivanje signala oštećene DNA sa zaustavljanjem staničnog ciklusa, aktivaciju popravka DNA i inhibiciju metastaze, a njihova inaktivacija često se povezuje s inicijacijom i razvojem tumora<sup>1</sup>.

Popravak DNA, naročito popravak dvolančanih lomova (engl. *DSB, double strand breaks*), nužan je za preživljavanje i normalnih i tumorskih stanica. Glavni putevi popravka dvolančanih lomova su popravak homolognom rekombinacijom (engl. *HR, homologous recombination*) i klasično nehomologno povezivanje krajeva (engl. *cNHEJ, classical nonhomologous end-joining*), iako je ponekad u popravak uključen i alternativni *NHEJ (aNHEJ)*<sup>2</sup>. Nepravilan popravak DNA može dovesti do mutacija i kromosomskih aberacija koje mijenjaju funkcije tumor supresora i dovode do pojave tumora<sup>1</sup>.

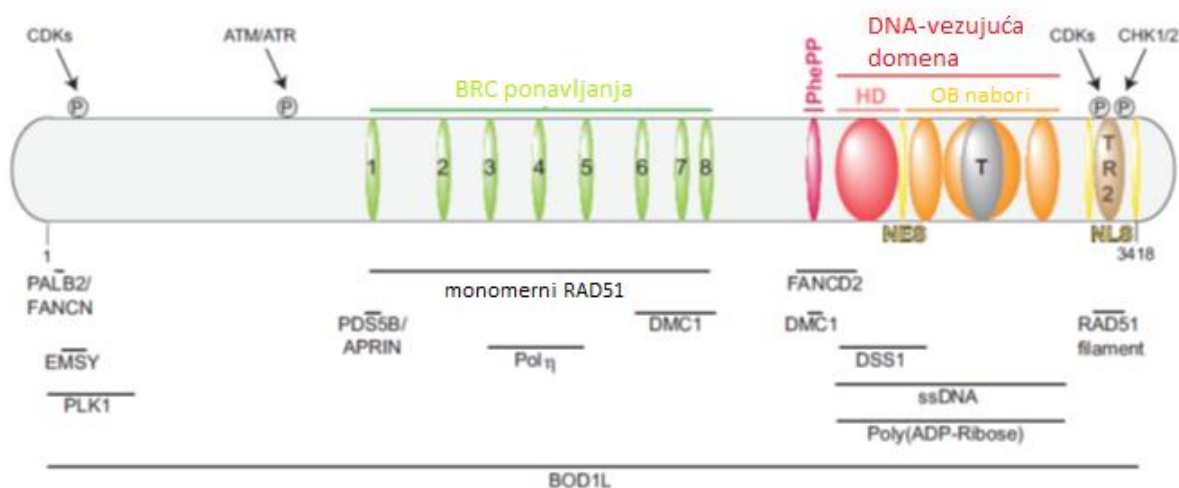
Ovaj seminar opisuje ulogu tumor supresora *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* i *PTEN* te njihov utjecaj na mehanizme popravka oštećene DNA. Mutacije u jednoj kopiji *BRCA1* ili *BRCA2* gena uzrokuju sindrom nasljednog raka dojke i jajnika (engl. *hereditary breast and ovarian cancer, HBOC*), odgovoran za 5-7% ukupnih slučajeva raka dojke. *BRCA1* je uključen u nekoliko staničnih procesa poput regulacije staničnog ciklusa i transkripcije, remodeliranja kromatina, popravka dvolančanih lomova i apoptozu, a *BRCA2* ima funkciju promoviranja popravka dvolančanih lomova homolognom rekombinacijom<sup>2</sup>. *TP53* regulira procese poput apoptoze, popravka DNA i zaustavljanja staničnog ciklusa, a njegova funkcija tumor supresora izgubljena je u više od 50% rakova kod ljudi<sup>3</sup>. *TP53* ima važnu ulogu facilitatora popravka DNA tako da zaustavlja stanični ciklus da bi mašinerija za popravak DNA mogla djelovati, ali i izravno utječe na aktivnost različitih mehanizama za popravak DNA<sup>1</sup>. Fosfataza i tenzin homologni gen *PTEN* negativno regulira količinu fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfata i tako suprimira PI3K signalni put te ima ulogu u popravku DNA, obnovi matičnih stanica, starenju i migraciji stanica, a ujedno je i jedan od najčešće mutiranih gena u stanicama tumora.

## 2 Tumor supresori

### 2.1 BRCA2

#### 2.1.1 Struktura BRCA2 proteina

BRCA2 postoji uglavnom kao homodimer i ima nekoliko važnih strukturnih elemenata: BRC ponavljanja koja se sastoje od osam konzerviranih motiva, DNA-vezujuću domenu sastavljenu od helikalne domene (HD) i tri oligonukleotid/oligosaharid-vezujuća proteinska nabora (OB) te od C-terminalne TR2 domene (Slika 1)<sup>4</sup>.



Slika 1. Strukturni elementi BRCA2 proteina. N-terminalna domena se povezuje s drugim proteinima poput PALB2 i EMSY. BRC ponavljanja uglavnom su uključena u vezanje za monomerni RAD51, ali sudjeluju i u drugim protein-protein interakcijama (PDS5B, DMC1...). DNA-vezujuća domena promovira vezanje BRCA2 za jednolančanu DNA i ADP-Ribozu. C-terminalna TR2 domena interagira s RAD51 nukleofilamentima, a sadrži i jezgrine lokalizacijske signale (NL) koji su važni za lokalizaciju BRCA2 u jezgri<sup>4</sup>.

BRCA2 se veže na monomerni RAD51 preko BRC ponavljanja, a nekoliko mutacija koje utječu na ta ponavljanja povezuju se s predispozicijama za rak<sup>5</sup>. C-terminalna TR2 domena također ostvaruje međureakcije s RAD51 i stabilizira nukleofilamente, a kod ljudi se njena delecija povezuje s rakom dojke i jajnika<sup>6</sup>. Fosforilacija TR2 domene ciklin-ovisnim kinazama oslabljuje vezu između BRCA2 i RAD51 i promovira disocijaciju RAD51 kompleksa na početku mitoze, što je način da se onemogući popravak homolognom rekombinacijom u mitozu. Njegovo onemogućavanje važno je za genomsku stabilnost jer aktivni popravak dvolančanih

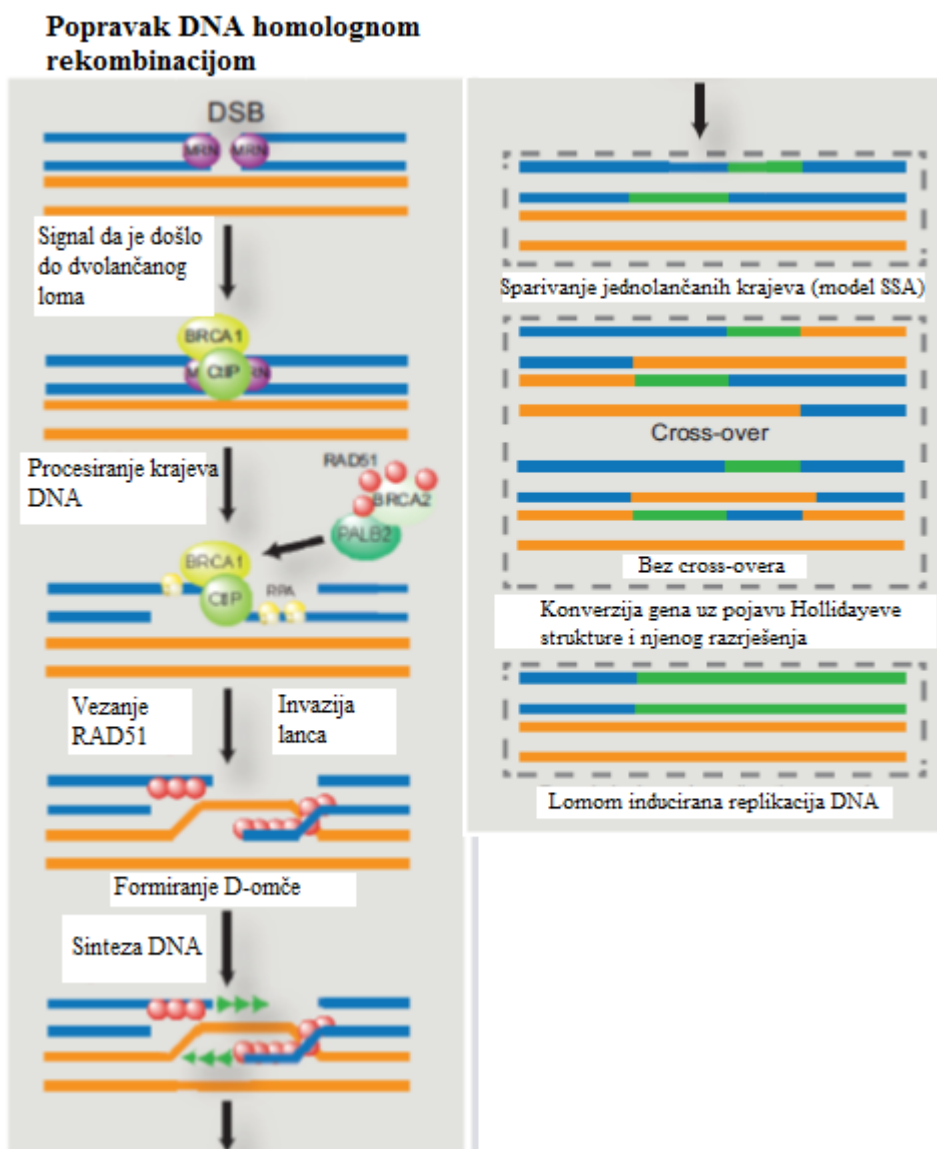
lomova ugrožava ispravnu segregaciju kromosoma u mitozu<sup>7,8</sup>. Glavna funkcija OB nabora je vezanje BRCA2 za ssDNA i promoviranje vezanja RAD51 za tu DNA.

### 2.1.2 Funkcije *BRCA2* i *BRCA1*

Dvolančani lomovi DNA često se smatraju najštetnijim DNA lezijama jer je dovoljan jedan takav lom da dođe do stanične smrti, a također može doći i do rearanžmana genoma - gubitka segmenta kromosoma ili translokacija. Takve lomove uglavnom popravljaju dva različita puta, već spomenuti cNHEJ i HR. cNHEJ je aktivan kroz cijeli stanični ciklus, za razliku od HR-a koji je ograničen na S/G2 fazu. cNHEJ ne treba ili treba jako malo procesiranja krajeva DNA da bi obavio svoju ulogu brze ligacije krajeva DNA, dok je za HR potrebno procesiranje, odnosno formacija 3' jednolančane DNA (ssDNA) koja omogućuje invaziju lanca u dvolančanu DNA u mjestu homologije. Izbor puta popravka DNA kontroliran je antagonističkim odnosom tumor supresora p53-vezujućeg proteina (53BP1) i BRCA1 proteina<sup>4</sup>.

U G1 fazi staničnog ciklusa dolazi do akumulacije 53BP1 koji se veže na dvostruko metilirane histone H4 i ubikvitinirani histon H2A u području dvolančanog loma. Rezultat akumulacije je povećana mobilnost kromatina u području oko dvolančanog loma. 53BP1 također promovira novačenje nizvodnih efektoru poput RIF1, PTIP i MAD2L2 za koje se smatra da ograničavaju pristup BRCA1 dvolančanom lomu i na taj način inhibiraju procesiranje krajeva DNA. Svi ti efektori zajedno na taj način promoviraju cNHEJ u G1 fazi<sup>4</sup>.

U S/G2 fazi dolazi do novačenja BRCA1 proteina zajedno s proteinom CtIP nakon što je kompleks MRN prepoznao dvolančani lom. Procesiranje krajeva DNA obavljaju CtIP, helikaza DNA2 i egzonukleaza 1 (EXO1) uz pomoć helikaze BLM. Nastali ssDNA krajevi zatim se omotaju RPA kompleksom koji ih štiti od cijepanja nukleazama i formiranja ukosnica. Uz promoviranje procesiranja krajeva, BRCA1 promovira i novačenje BRCA2. BRCA2 zatim stimulira uklanjanje RPA s DNA i vezanje RAD51 rekombinaze, što dovodi do invazije i izmjene lanca (Slika 2)<sup>4</sup>.



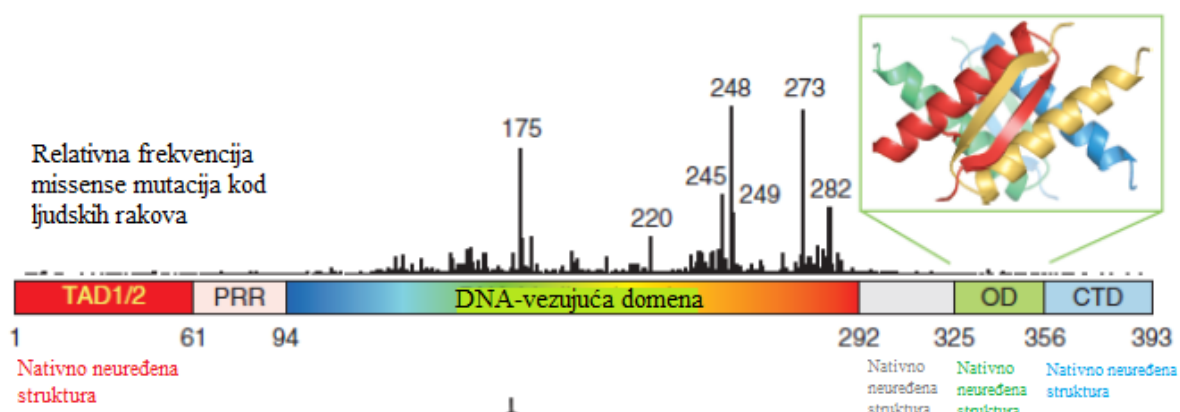
Slika 2. MRN kompleks prepoznaje dvolančani lom i regrutira BRCA1 i CtIP. CtIP, DNA2 i egzonukleaza Exo1 procesiraju krajeve DNA, unovačeni BRCA2 uklanja RPA s DNA i stimulira vezanje na 3' kraj DNA RAD51 proteine koji omogućuju invaziju procesiranog lanca u homolognu DNA. Slijedi formiranje D-omče i njeno razrješavanje<sup>4</sup>.

## 2.2 TP53

### 2.2.1 Struktura p53 proteina

p53 (Slika 3) sadrži amino-terminalnu transaktivacijsku domenu (TAD), nakon čega slijedi regija bogata prolinom (PRR, engl. *proline rich region*) koja je uključena u regulaciju apoptoze. DNA-vezujuća i tetramerizacijska domena (OD) su povezane fleksibilnom veznom

(engl. *linker*) regijom u kojoj se nalazi jezgrin lokalizacijski signal, a na karboksi-terminalnom kraju se nalazi karboksi-terminalna domena (CTD). TAD i CTD domena su nativno neuređene (engl. *intrinsically disordered*), odnosno ne posjeduju jedinstvenu stabilnu tercijarnu strukturu pri fiziološkim uvjetima, nego izrazito varijabilni skup struktura koje omogućuju međureakcije s različitim proteinima i adaptabilnost. TAD domena aktivira transkripcijske faktore koji reguliraju nekoliko proapoptotičkih gena<sup>9</sup>. Mutacije u DNA-vezujućoj domeni kod ljudskih tumora su puno češće nego mutacije u ostalim domenama p53<sup>10</sup>.



Slika 3. p53 sadrži amino-terminalnu transaktivacijsku domenu (TAD), regiju bogatu prolinom (PRR), DNA-vezujuću i tetramerizacijsku domenu (OD) povezanu fleksibilnom veznom te karboksi-terminalnu domenu (CTD). Vertikalne linije prikazuju relativnu frekvenciju mutacija krivog smisla (missense) kod tumora za svaku aminokiselinu, pri čemu se vidi da je većina mutacija u tumorima prisutna upravo u DNA-vezujućoj domeni<sup>10</sup>.

### 2.2.2 Funkcije TP53

Protein p53, kodiran genom *TP53*, funkcionira kao transkripcijski faktor koji inducira ili inhibira ekspresiju gena specifičnim vezanjem za p53-osjetljive elemente (engl. *p53 responsive elements*, *P53RE*) u obliku tetramera. p53 ima 6 domena, od kojih je za njegovu ulogu tumor supresora najvažnija središnja domena. Naime, više od 90% *TP53* mutacija koje uzrokuju rak nalazi se upravo u toj domeni<sup>11</sup>. p53 doprinosi stabilizaciji genoma tako da osigurava stanicama vrijeme da poprave DNA prije nego što se nastavi proliferacija stanica. Naime, kada je oštećenje prisutno prije ulaska stanice u S fazu, p53 zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi tako da inducira transkripciju p21, inhibitora ciklin-ovisnih kinaza. Osim što inhibira ciklin-ovisne kinaze, p21 se veže na PCNA, faktor koji je potreban za procesivnost DNA polimeraze  $\sigma$  te tako onemogućuje sintezu DNA u S fazi<sup>12</sup>. p53 može aktivirati proteine uključene u popravak

DNA, a ima i evolucijski konzerviranu proapoptotičku funkciju koja se iskorištava u slučajevima kada su oštećenja prevelika da bi se mogla popraviti<sup>1</sup>

#### 2.2.2.1 p53 i popravak izrezivanjem nukleotida

Popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, *NER*) je uz popravak izrezivanjem baza (engl. *base excision repair*, *BER*) i popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, *MMR*) važan put popravka jednolančanih oštećenja DNA, posebice onih uzrokovanih UV svjetlošću kao što su pirimidinski (timinski) dimeri i 6,4-fotoprodukti. Prema početnim koracima prepoznavanja oštećenja, mogu se razlikovati globalni genomski NER (GG-NER) i NER sparen s transkripcijom (TC-NER). GG-NER ne ovisi o transkripciji, može djelovati u bilo kojem dijelu genoma te koristi DDB1 i DDB2 proteine i XPC-Rad23B kompleks koji prepoznaju distorzije heliksa. TC-NER ovisi o transkripciji, odnosno za prepoznavanje oštećenja koristi RNA-polimerazu koja je blokirana na području lezije<sup>13</sup>. p53 sudjeluje u GG-NER-u, dok za njegovu ulogu u TC-NER-u postoji puno manje dokaza<sup>1</sup>.

Protein DDB2 zajedno s DDB1 tvori UV-DDB heterodimer koji pomaže u regrutaciji XPC u ranim koracima NER-a. Nakon UV-induciranog oštećenja DNA, aktivirani p53 inducira ekspresiju *p48* gena (DDB2) i *XPC* gena te na taj način povećava kapacitet stanice da popravi oštećenja<sup>1</sup>.

Osim kao transkripcijski faktor, p53 sudjeluje u NER-u i na druge načine. p53 utječe na helikaznu aktivnost XPB i XPD<sup>14</sup>, a može i modulirati relaksaciju kromatina<sup>15</sup>. GG-NER i TC-NER susreću se kod relaksacije DNA pomoću multimernog proteina TFIIH, odnosno pomoću helikazne aktivnosti njegovih podjedinica, XPB i XPD. *In vitro*, XPB i XPD pokazuju međureakciju s p53 koja dovodi do smanjenja njihove helikazne aktivnosti. Nakon prepoznavanje lezije u TC-NER putu, kromatin se relaksira. Rubbi i suradnici<sup>15</sup> su postavili hipotezu da globalna relaksacija kromatina dovodi do poboljšane detekcije lezija, a da ta relaksacija ovisi o p53-ovisnoj regrutaciji p300 histon acetilaze koja na mjestima oštećenja acetilira H3 podjedinicu histona.



#### 2.2.2.2 p53 i popravak izrezivanjem baza

Popravak izrezivanjem baza (BER) važan je za popravak alkilacija, oksidacija, deaminacija, depurinacija i jednolančanih lomova. je prepoznavanje. Početni korak u BER-u je pretraga DNA za lezijama pomoću DNA glikozilaza koje cijepaju N-glikozilnu vezu između baze i šećera. Nastalo apurinsko/apirimidinsko (AP) mjesto prepoznato je od apurinske/apirimidinske endonukleaze koja ga pocijepa, ostavljajući 3' OH kraj koji služi kao supstrat za DNA polimerazu  $\beta$ <sup>16</sup>.

AP endonukleaza APE1/Ref-1 pojačava vezanje p53 na DNA *in vitro* i *in vivo*<sup>17</sup> te promovira tetramerizaciju p53<sup>18</sup>. Uz tu transkripcijski neovisnu međureakciju s APE1, p53, tumor supresor, također i izravno suprimira transkripciju *APE1* gena<sup>19</sup> uključenog u popravak DNA, što se naizgled čini kontradiktorno. Zaky i suradnici<sup>19</sup> predlažu da takva funkcija zapravo doprinosi tumor supresorskoj funkciji p53 jer p53 na taj način u slučaju jako oštećenih genoma usmjerava odgovor na oštećenje u smjeru apoptoze. Tu hipotezu potvrdili su Offer i suradnici: kod malih doza tvari koje oštećuju DNA, BER aktivnost se neposredno povećava, a kod visokih doza se smanjuje aktivnost BER-a i dolazi do p53-ovisne apoptoze. Također su pokazali i da p53 pojačava aktivnost BER-a u G0 i G1 fazi staničnog ciklusa, dok u G2 i M fazi smanjuje njegovu aktivnost te inducira apoptozu<sup>20</sup>

#### 2.2.2.3 p53 i nehomologno povezivanje krajeva

Od dva glavna puta popravka dvolančanih lomova, najmanje je razjašnjena povezanost p53 s NHEJ putem. Iako su uočene međureakcije p53 s nekoliko komponenata tog puta<sup>1</sup> koje se očituju kao nizvodni učinci na stanično preživljenje i kontrolu staničnog ciklusa, njihovi molekularni mehanizmi još uvijek nisu razjašnjeni.

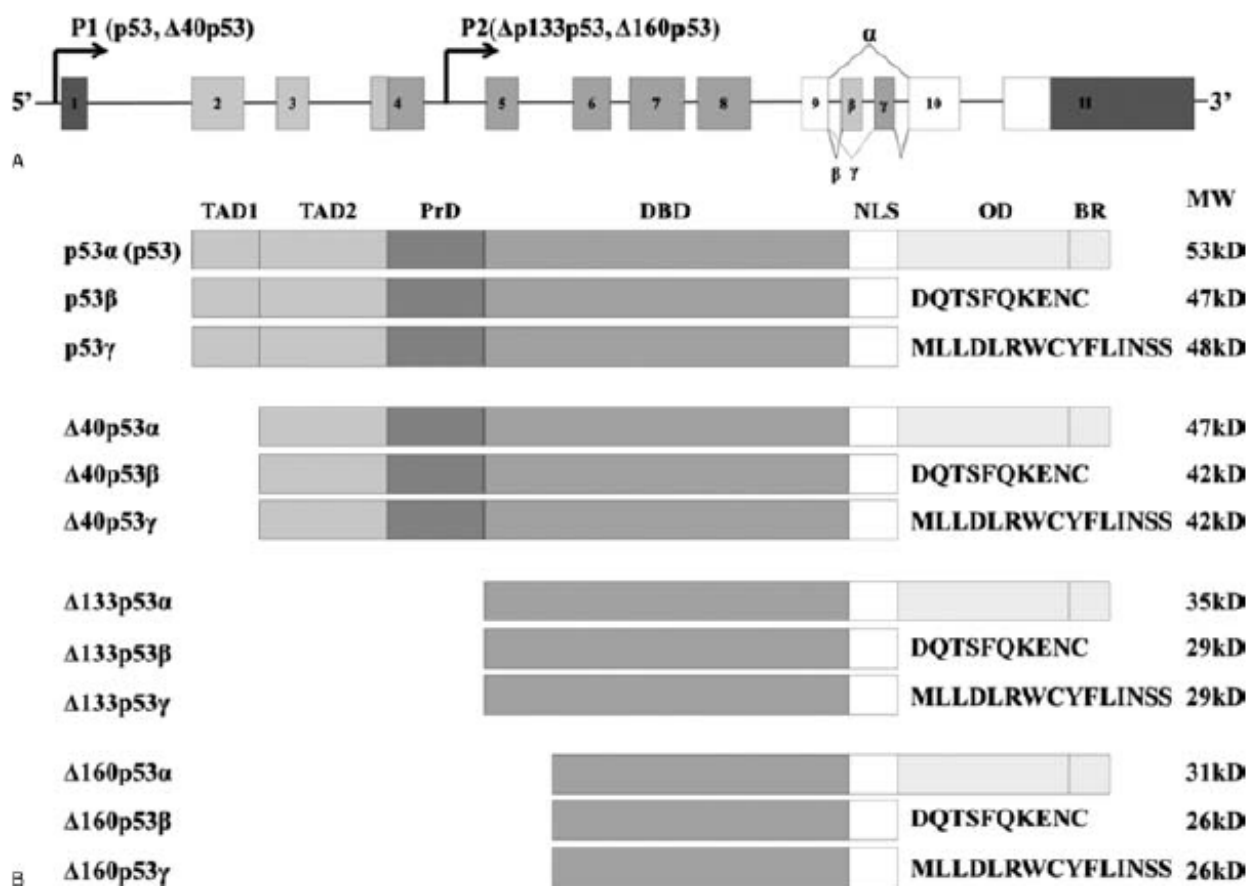
#### 2.2.2.4 p53 i homologna rekombinacija

Uz mogućnost izravne regulacije ekspresije RAD51 rekombinaze tako da se veže na njen promotor<sup>21</sup>, p53 utječe na homolognu rekombinaciju i tako da izravno stvara međureakcije s RAD51 i RAD54 proteinima, a da se frekvencija spontane homologne rekombinacije i one uzrokovane oštećenjima povećava prilikom inhibicije p53<sup>22</sup>. Linke i suradnici pokazali su da

do tog učinka dolazi zbog p53-RAD51 međureakcije te su zaključili da p53 svojim međureakcijama s RAD51 i RAD54 inhibira rekombinaciju u slučajevima kada je ona nepotrebna te da tako suprimira potencijalnu nestabilnost genoma<sup>23</sup>.

### 2.2.3 Izoforme p53

*TP53* gen se sastoji od 11 egzona i u teoriji se kroz alternativno izrezivanje, alternativnu inicijaciju translacije i kroz korištenje alternativnih promotora može eksprimirati kao 12 različitih p53 izoforma (Slika 4): p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 160p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 160p53 $\beta$  i  $\Delta$ 160p53 $\gamma$ <sup>3</sup>.



Slika 4. A) Shematski prikaz stukture *TP53* gena u kojemu su vidljiva mjesta alternativnog izrezivanja (a, b, g) i alternativni promotori (P1, P2). B) *TP53* može biti eksprimiran u obliku 12 izoforma proteina. BR=bazična regija, DBD=DNA-vezujuća domena, NLS=jezgrin lokalizacijski signal, OD=oligomerizacijska domena, PRD=prolin-bogata domena, TAD=transkripcijska aktivacijska domena<sup>3</sup>.

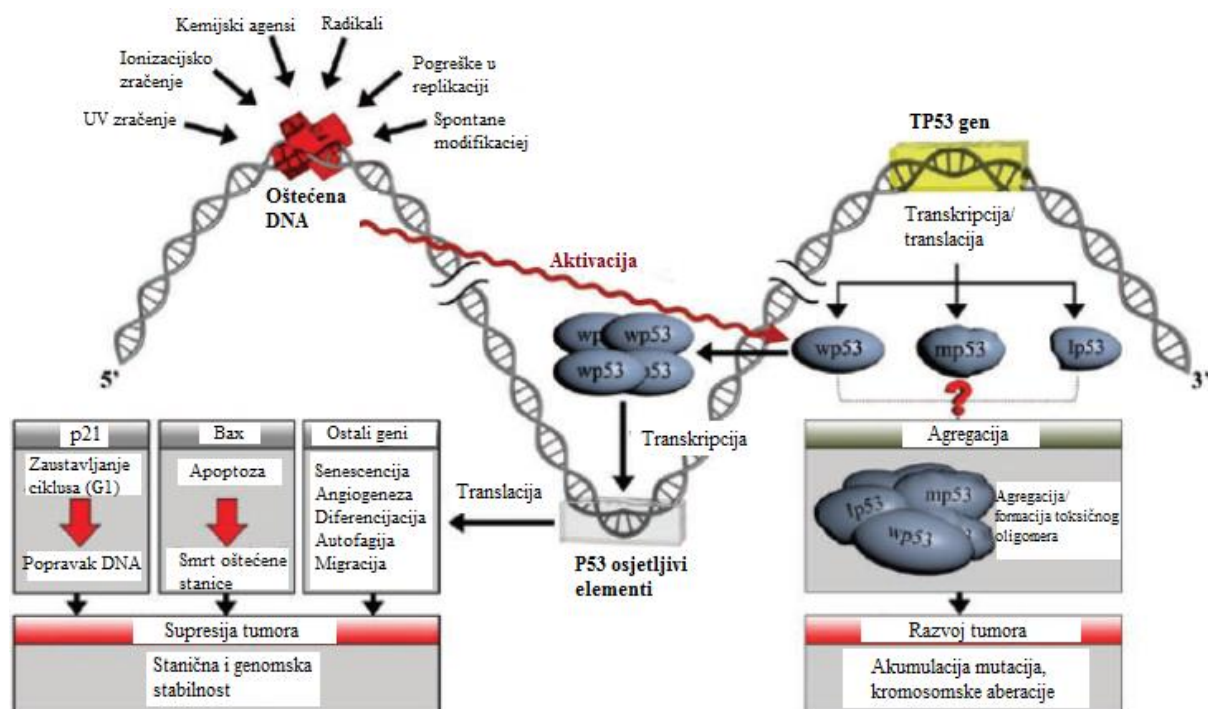
Različite izoforme imaju različite tumor supresorske funkcije te se eksprimiraju različito u različitim tipovima raka. Na primjer, napredovanje kolorektalnog adenoma u karcinom se može predvidjeti omjerom p53 $\beta$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , a prekomjerna ekspresija p53 $\beta$  je također povezana s napredovanjem tumora<sup>24</sup>.

#### **2.2.4 Agregacija p53 proteina**

Potvrđeno je prisustvo brojnih agregata nalik prionima kao rezultat fizikalnih međureakcija središnjih domena p53<sup>25</sup>, a kasnije su nađene slične strukture nastale međureakcijom transaktivacijskih i tetramerizacijskih domena. U agregaciji važnu ulogu igra p53 mutant R248Q koji funkcionira kao ‘‘sjeme’’ za agregaciju p53, uključujući i divljeg tipa p53, ali i drugih proteina poput p63 i p73. Takvi agregati imaju citotoksičan učinak jer ometaju normalne funkcije p53<sup>26</sup>.

##### **2.2.4.1 Hipoteza o ulozi izoforma u induciranju agregacije**

Slika 5 prikazuje wp53 (divlji tip p53) tetramer koji se normalno formira kao odgovor na oštećenje DNA. Kim i suradnici<sup>3</sup> pretpostavljaju da bi se p53 trebao vezati na p53RE i aktivirati p21, BAX i ostale proteine u tumor supresorskim putevima. Nasuprot tome, mutacija u TP53 genu mogla bi izmijeniti transkripciju/translaciju mutiranog p53 (mp53) ili različitih izoforma p53 (Ip53), što može dovesti do agregacije divljeg tipa p53 i posljedično do supresije normalne funkcije p53.

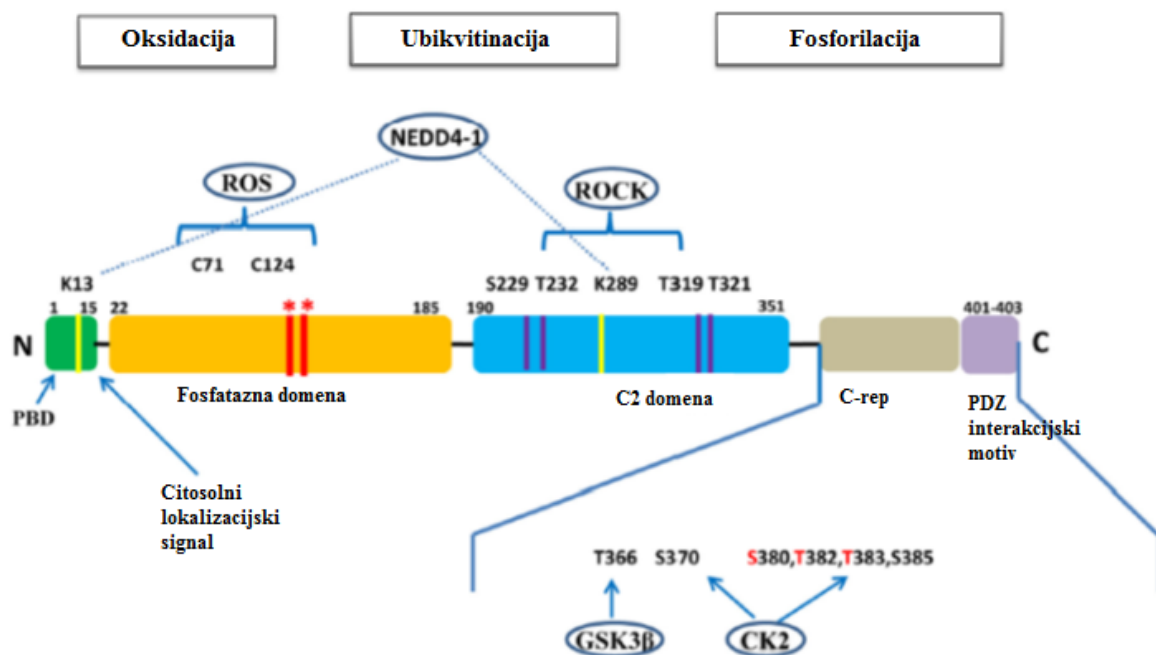


Slika 5. Različita djelovanja p53 proteina ovisno o tome dolazi li do agregacije ili ne. Ip53=i-zoforma p53, mp53=mutant p53, p53 REs=p53 osjetljivi elementi, wp53=divlji tip p53<sup>3</sup>.

## 2.3 PTEN

### 2.3.1 Struktura PTEN proteina

*PTEN* je tumor supresorski gen koji kodira za protein s lipid- i protein-fosfataznom aktivnošću. PTEN protein sastoji se od dvije funkcionalne domene (fosfatazna i C2 domena) i tri strukturne regije (N-terminalna PIP<sub>2</sub>-vezujuća domena, C-terminalna domena i PDZ-međureakcijski motiv) prikazane na Slici 6<sup>27</sup>.



Slika 6. Shematski prikaz domena PTEN proteina: N-terminalna PIP<sub>2</sub>-vezujuća domena (PBD), fosfatazna domena, C2 domena, C-terminalni rep fosforiliran od glikogen sintaze kinaze 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) i PDZ-međureakcijski motiv. Mutacije koje onemogućuju fosfataznu aktivnost prikazane na slici su C124S (lipid- i protein- fosfatazna aktivnost) i G129E (lipid-fosfatazna aktivnost). Mutacije na položajima S380, T382 i T383 mogu destabilizirati PTEN i pojačati fosfataznu aktivnost. Na položajima K13 i K2289 dolazi do ubikvitinacije PTEN-a<sup>27</sup>.

### 2.3.2 Funkcije *PTEN*-a

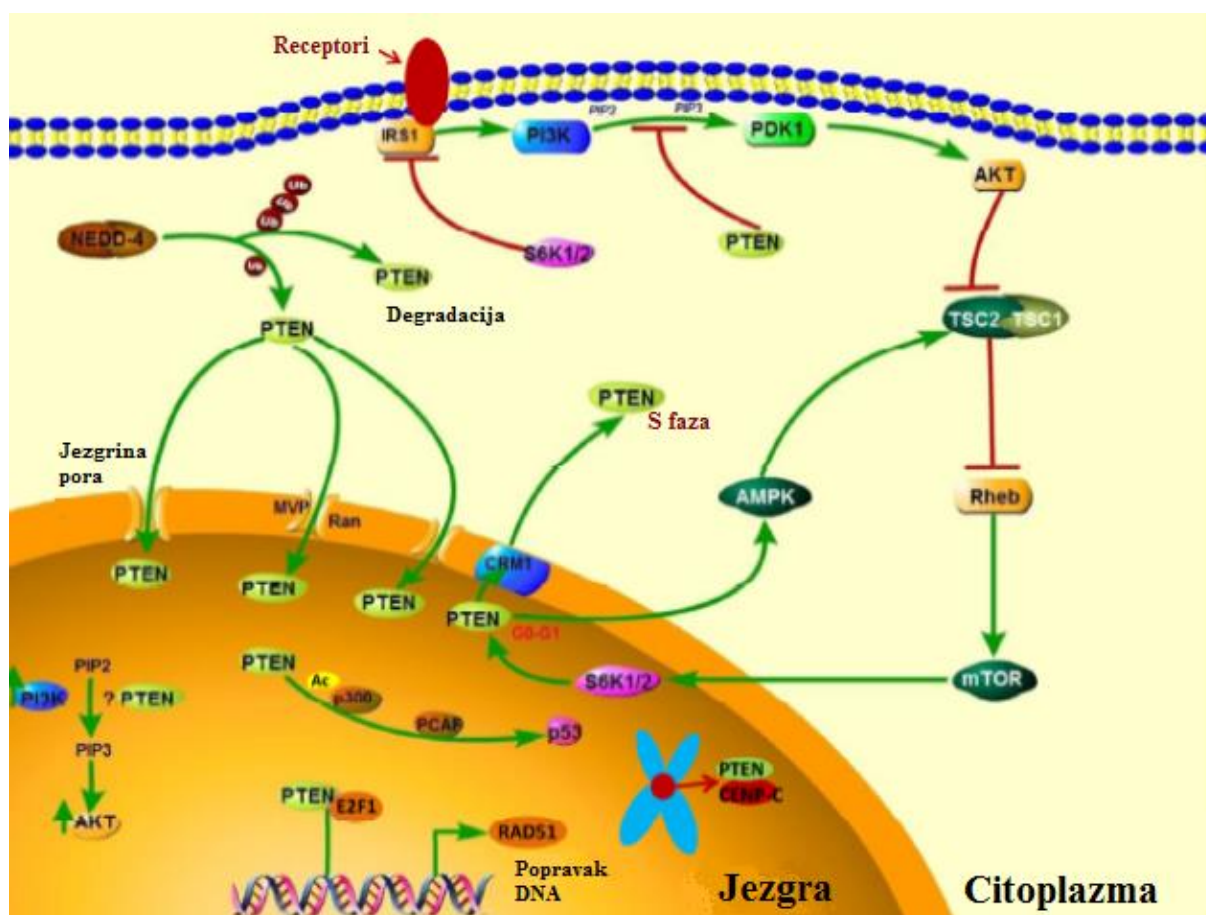
PTEN je fosfataza koja defosforilira fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat (PIP<sub>3</sub>), produkt fosfoinozitol 3-kinaze (PI3K), dajući fosfatidilinozitol (4,5)-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>). Nedostatak funkcionalnog PTEN-a uzrokuje nakupljanje PIP<sub>3</sub> i tako suprimira PI3K signalni put. PTEN ima različite uloge ovisno o tome nalazi li se u citoplazmi ili u jezgri: u citoplazmi ima ulogu fosfataze koja negativno regulira PI3K/AKT put, dok u jezgri utječe na rast stanice neovisno o AKT-u<sup>27</sup>.

Tumor supresorska funkcija PTEN-a djeluje tako da antagonizira put PI3K/PTEN/ciljne molekule rapamicina (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR). Gubitkom PTEN-a, nakupljeni PIP<sub>3</sub> na plazmatskoj membrani regrutira i aktivira proteine poput fosfoinozitol-ovisne kinaze 1 i AKT proteina (protein kinaza B). AKT aktivacija dovodi do aktivacije kompleksa

mTOR kinaze. Aktivni mTOR kompleks promovira sintezu proteina i lipida te povećava proizvodnju energije glikolizom da omogući te sintetske procese, a ujedno i blokira kataboličke procese poput autofagije. Hiperaktivacija tog puta dovodi do nekontroliranog rasta i proliferacije uz veliku zalihu potrebnih makromolekula i energije<sup>27</sup>.

PI3K/PTEN/AKT/mTOR put je nužan za promoviranje rasta i proliferacije odraslih matičnih stanica, ali kod mnogih rakova je pretjerano aktivan, što dovodi do manje učestalosti apoptoze i veće proliferacije stanica raka<sup>27</sup>.

Sve više dokaza pokazuje da translokacija PTEN-a iz jezgre u citoplazmu dovodi do raka te da se jezgrin PTEN može iskoristiti kao indikator za prognozu napredovanja raka. U primarnim i diferenciranim stanicama PTEN se nalazi uglavnom u jezgri, dok je njegova koncentracija u jezgri značajno reducirana u brzo rastućim stanicama raka<sup>28</sup>. Njegove citoplazmat-ske i jezgrine funkcije opisane su u Slici 7.



Slika 7. U citoplazmi, PI3K se aktivira nakon stimulacije receptora. PI3K aktivacija dovodi do pretvaranja PIP<sub>2</sub> u PIP<sub>3</sub>, a time do AKT aktivacije koja stimulira stanični rast i proliferaciju. PTEN defosforilira PIP<sub>3</sub> i tako suprimira PIK3 put. NEDD4-1 je ligaza koja posreduje u ubikvitinaciji PTEN-a. Njegova poliubikvitinacija dovodi do njegove degradacije u citoplazmi, dok monoubikvitinacija dovodi do njegove translokacije u jezgru putem pasivne difuzije, preko Ran proteina i drugim mehanizmima posredovanima monoubikvitinacijom.

U jezgri, PTEN promovira acetilaciju p53 kao odgovor na oštećenje DNA, stabilizira integritet genoma vezanjem na centromerni protein C (CENPC) i sudjeluje u popravku DNA povećavanjem ekspresije RAD51 rekombinaze<sup>27</sup>.

#### **2.3.2.1 PTEN u popravku DNA**

Kod raka kože u ljudi, PTEN je značajno manje eksprimiran. He i Ming<sup>29</sup> su pokazali da PTEN pozitivno regulira GC-NER u keratinocitima tako da promovira transkripciju XPC-a koji sudjeluje u popravku izrezivanjem nukleotida. PTEN/AKT/p38 put utječe na NER tako da regulira ekspresiju XPC-a. Naime, smanjena ekspresija PTEN-a dovodi do aktivacije AKT proteina, a oni suprimiraju p38 kinazu te na taj način smanjuju razinu XPC-a.

PTEN također ostvaruje međureakcije s drugim tumor supresorima. Xiang i suradnici<sup>30</sup> su pokazali da deficijencija BRCA1 aktivira AKT put, a aktivacija PI3K kinaze je također udružena s BRCA1-povezanim rakom dojke, što navodi na zaključak da PI3K/AKT put ima važnu ulogu u proliferaciji tumorskih stanica u kojima ulogu igra i BRCA1. U raku dojke, BRCA1 može negativno utjecati na AKT aktivaciju izravnim kontaktom<sup>31</sup>.

PTEN može surađivati i s p53 neovisno o AKT-u. Aktivni PTEN suprimira ne samo AKT, nego i MDM2 aktivnost, što dovodi do povećanja razine p53 i tako do apoptoze i zaustavljanje G2/M faza u slučaju DNA oštećenja<sup>32</sup>.

### 3 Literatura

1. Williams, A. B. & Schumacher, B. p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor Perspectives Med.* **6**, a026070 (2016).
2. Kan, C. & Zhang, J. BRCA1 mutation: A predictive marker for radiation therapy? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **93**, 281–293 (2015).
3. Kim, S. & An, S. S. A. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e3993 (2016).
4. Fradet-Turcotte, A., Sitz, J., Grapton, D. & Orthwein, A. BRCA2 functions: From DNA repair to replication fork stabilization. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, T1–T17 (2016).
5. Chen, J. *et al.* Stable Interaction between the Products of the BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Genes in Mitotic and Meiotic Cells. *Molecular. Cell* **2**, 317–328 (1998).
6. Håkansson, S. *et al.* Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 1068–1078 (1997).
7. Benada, J. & Macurek, L. Targeting the checkpoint to kill cancer cells. *Biomolecules* **5**, 1912–1937 (2015).
8. Orthwein, A. *et al.* Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard Against Telomere Fusions. *Science* **344**, 189–193 (2014).
9. Joerger, A. C. & Fersht, A. R. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol.* **2**, a000919 (2010).
10. Petitjean, A. *et al.* Impact of Mutant p53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database. *Hum. Mutat.* **28**, 622–629 (2007).
11. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol* **2**, a001008 (2010).
12. Zemojtel, T. & Vingron, M. P53 Binding Sites in Transposons. *Front. Genet.* **3**, (2012).
13. Friedberg, E. C. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *eLS* **36**, 1–8 (2001).
14. Léveillard, T. *et al.* Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO Journal* **15**, 1615–24 (1996).
15. Rubbi CP, M. J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO Journal* ;**22(4)**, 975-986 (2003).
16. Wallace, S. S. Base excision repair: A critical player in many games. *DNA Repair*



- (*Amst*). **19**, 14–26 (2014).
17. Jayaraman, L. *et al.* Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* **11**, 558–570 (1997).
  18. Hanson, S., Kim, E. & Deppert, W. Redox factor 1 (Ref-1) enhances specific DNA binding of p53 by promoting p53 tetramerization. *Oncogene* **24**, 1641–7 (2005).
  19. Zaky, A. *et al.* Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* **36**, 1555–1566 (2008).
  20. Offer, H. *et al.* Structural and functional involvement of p53 in BER in vitro and in vivo. *Oncogene* **20**, 581–589 (2001).
  21. Hine, C. M. *et al.* Regulation of Rad51 promoter. *Cell Cycle* **13**, 2038–2045 (2014).
  22. Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T. & Lopez, B. S. Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene* **18**, 3553–3563 (1999).
  23. Linke, S. P. *et al.* p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res.* **63**, 2596–2605 (2003).
  24. Song, W. *et al.* Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. *Chin. Med. J. (Engl)*. **122**, 921–6 (2009).
  25. Ishimaru, D. *et al.* Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry* **42**, 9022–7 (2003).
  26. Ano Bom, A. P. D. *et al.* Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. *J. Biol. Chem.* **287**, 28152–62 (2012).
  27. Wang, X., Huang, H. & Young, K. H. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging (Albany. NY)*. **7**, 1032–1049 (2015).
  28. Bassi, C. *et al.* Nuclear PTEN Controls DNA Repair and Sensitivity to Genotoxic Stress. *Science (80-. )*. **341**, 395–399 (2013).
  29. Ming, M. & He, Y.-Y. PTEN in DNA damage repair. *Cancer Lett.* **319**, 125–129 (2012).
  30. Xiang, T. *et al.* Negative Regulation of AKT Activation by BRCA1. *Cancer Res.* **68**, 10040–10044 (2008).
  31. Xiang, T. *et al.* Targeting the Akt/mTOR pathway in Brca1-deficient cancers. *Oncogene* **30**, 2443–2450 (2011).
  32. Minami, A., Nakanishi, A., Ogura, Y., Kitagishi, Y. & Matsuda, S. Connection

between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. *Front. Oncol.* **4**, 318 (2014).

## 4 Sažetak

Tumor supresori su geni koji štite stanice od progresije do tumora, a njihove mutacije, odnosno inaktivacije mogu uzrokovati razvoj tumora. Tumor supresori, odnosno njihovi proteinski produkti, imaju različite učinke na stanični ciklus: utišavaju gene važne za nastavak staničnog ciklusa i tako inhibiraju staničnu diobu, odgovaraju na signale oštećene DNA i povezuju ih sa staničnim ciklusom, stimuliraju apoptozu te inhibiraju metastazu. Tumor supresori sudjeluju u popravku DNA na način da promoviraju ili suprimiraju određeni mehanizam popravka DNA, kao što to rade p53 i PTEN, ali proteinski produkti tumor supresora ponekad mogu i izravno sudjelovati u popravku DNA, što je vidljivo kod proteina BRCA1 i BRCA2.

## 5 Summary

Tumor suppressors are genes involved in protecting cells from developing into tumors, and mutations of those genes, or more precisely, the inactivation of those genes, can stimulate tumor development. Tumor suppressors, or to be more specific, their protein products, have diverse effects on the cell cycle: they repress genes essential in the continuing of the cell cycle and therefore inhibit cell division, respond to DNA damage signals and couple them with the cell cycle, promote apoptosis and inhibit metastasis. Tumor suppressors are also involved in DNA repair mechanisms, either by promoting or suppressing specific repair mechanisms, which can be observed with p53 and PTEN, or by direct involvement of the tumor suppressor proteins in DNA repair, with the best examples being BRCA1 and BRCA2.